

# 培養血管平滑筋細胞におけるインスリンシグナル伝達経路とその脱感作

著者	高木 敬文
発行年	1994-03-24
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/2024">http://hdl.handle.net/10422/2024</a>

氏名・(本籍)	高 木 敬 文 (千葉県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第160号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成6年3月24日
学 位 論 文 題 目	培養血管平滑筋細胞におけるインスリンシグナル伝達経路とその脱感作
審 査 委 員	
	主査 教授 北 里 宏
	副査 教授 戸 田 昇
	副査 教授 繁 田 幸 男

## 論 文 内 容 要 旨

### [目 的]

近年、インスリン感受性低下を伴う高インスリン血症患者では動脈硬化症が早期から発症・進展すると報告されている。しかし、血管を構築する細胞へのインスリン作用の詳細は依然不明である。そこで、動脈硬化症の発症・進展に重要な役割を担っていると考えられる血管平滑筋細胞へのインスリン作用について、インスリン受容体とそのシグナル伝達の面から検討し、更にその脱感作についてIGF-I作用と比較した。

### [方 法]

雄性SDラット胸部大動脈より単離・培養した血管平滑筋細胞を用い、以下の実験を行った。

1. 血管平滑筋細胞へのインスリンおよびIGF-I結合を測定した。また、インスリンおよびIGF-I結合に対する12時間インスリン前処置の影響を検討した。
2. 血管平滑筋細胞から部分精製したインスリン受容体の自己リン酸化能を測定し、インスリンによる自己リン酸化能の促進を検討した。
3. 血管平滑筋細胞から抽出した可溶性分画中の40Sリボゾーム蛋白リン酸化活性 (S6キナーゼ活性) を測定し、インスリン、IGF-Iによるその酵素の活性化を検討した。
4. S6キナーゼ活性を、MonoQクロマトグラフィーを用い、0-0.5 M NaClにてlinear gradientに溶出し、インスリン特異的に活性化されるS6キナーゼの特性を検討した。
5. 血管平滑筋細胞をインスリンと12時間前処置しインスリン受容体を脱感作した後、インスリンおよびIGF-IによるS6キナーゼ活性化を検討した。

### [結 果]

1. 血管平滑筋細胞へのインスリンおよびIGF-I結合  
培養血管平滑筋細胞へのインスリン結合のIC<sub>50</sub>は $0.33 \pm 0.02$  nMであり、そのScatchard analysisから受容体数は $12.8 \pm 0.86$  fmol/0.5 mg proteinであった。IGF-I結合のIC<sub>50</sub>は $6.63 \pm 0.88$  nM、受容体数は $1200 \pm 170$  fmol/0.5 mg proteinであった。インスリン12時間処置によりインスリン結合、受容体数はそれぞれ対照より39%、34%低下したが、IC<sub>50</sub>には有意差は認めなかった。IGF-I結合は同処置により変化しなかった。
2. インスリン受容体の自己リン酸化

分子量95 kDaに位置するインスリン受容体 $\beta$ サブユニットは、インスリン刺激により、0.17 nMから濃度依存性に磷酸化された。

### 3. インスリンによるS6キナーゼ活性化

S6キナーゼ活性の基礎値は $0.73 \pm 0.05$  pmol/min/mg proteinで、1 nM、10 nM、100 nM、1  $\mu$ Mインスリン刺激により基礎値に比し各々37%、77%、182%、370%増加した。

### 4. MonoQクロマトグラフィーによる検討

NaCl濃度0.2 M (ピーク1) および0.35 M (ピーク2) 付近に溶出される2つのキナーゼ活性を認めた。S6キナーゼ活性のほとんどがピーク2に認められ、この活性のみが、インスリンおよびIGF-I刺激により増強された。

### 5. インスリン12時間前処置のS6キナーゼ活性への影響

S6キナーゼ活性 (pmol/min/mg protein) の基礎値は対照群の $0.74 \pm 0.15$ に比べ、処置群で $0.58 \pm 0.15$ と若干低下したが、その差は有意ではなかった。しかし、10 nMインスリン刺激後のS6キナーゼ活性は対照群の $1.34 \pm 0.38$ に対し、処置群で $0.78 \pm 0.16$ と42%低値であった。一方、IGF-I刺激によるS6キナーゼ活性化は対照群 $2.16 \pm 0.68$ 、処置群 $2.10 \pm 0.53$ と変化しなかった。

## [考 察]

血管平滑筋細胞においてインスリンの受容体への結合のIC<sub>50</sub>はヒト脂肪組織と同程度であり、高い親和性を示した。更に、血管平滑筋細胞のインスリン受容体は0.17 nM(24  $\mu$ M/ml)という生理的濃度のインスリンにより自己磷酸化されることをはじめて証明した。

S6キナーゼ活性は1 nM(144  $\mu$ U/ml)インスリンにより有意に増加し、受容体以降のインスリンのシグナル伝達経路の活性化が示された。また、この活性のMonoQクロマトグラフィーにおける溶出特性は骨格筋で報告されているものと一致していた。

既報のインスリン感受性組織と同様にインスリンと長時間孵置することでインスリンシグナル伝達経路は脱感作されたが、IGF-Iシグナル伝達経路はその影響を受けなかった。以上のことより、血管平滑筋細胞においてもインスリンに特異的なシグナル伝達機構の存在が示唆された。

## [結 語]

1. 血管平滑筋細胞において生理的濃度のインスリンにより、蛋白磷酸化を介してインスリンのシグナル伝達経路が活性化された。
2. このシグナル伝達経路は、インスリン前処置により特異的に脱感作され、血管平滑筋細胞においてもインスリン感受性組織と同様に、インスリン特異的なシグナル伝達機構が存在した。

## 学位論文審査の結果の要旨

近年、高インスリン血症を有する症例では動脈硬化症が早期から発症・進展すると報告されているが、血管を構築する細胞へのインスリン作用の詳細に関しては依然不明である。本論文では、血管平滑筋細胞 (SMC) におけるシグナル伝達経路について、インスリンの作用とinsulin-like growth factor (IGF-I) の作用とを比較検討した。

実験には、ラット大動脈より単離・培養したSMCを用いた。細胞へのインスリンおよびIGF-Iの結合を、<sup>125</sup>Iラベルした各ペプチドを用い測定した。細胞より部分精製したインスリン受容体を各濃度

のインスリンで刺激した後、受容体への $^{32}\text{P}$ の取り込みにより自己磷酸化能を評価した。細胞のMAPキナーゼ活性とS6キナーゼ活性として、それぞれミエリン塩基蛋白と40Sリボソーム蛋白を基質とする磷酸化能を測定し、インスリンおよびIGF-I刺激の影響を検討した。インスリンまたはIGF-I刺激によるDNA合成能の変化を細胞への $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みで測定した。

本研究によって以下の点が明らかにされた。1) インスリン受容体およびIGF-I受容体が存在した。2) このインスリン受容体が生理的濃度のインスリン刺激により自己磷酸化された。3) 生理的濃度のインスリンにより、SMCのS6キナーゼが活性化された。4) インスリンで前処理するとインスリン受容体は減少し、インスリン刺激によるS6キナーゼの活性化は減弱したが、IGF-Iの作用には変化は認められなかった。以上の結果はSMCにおいて、生体内で認められる濃度のインスリンにより、インスリン受容体を介し、細胞機能を制御する機構が活性化されることを示唆している。

本論文は、SMCへのインスリン作用と、受容体の脱感作の機構を示した興味あるものであり、博士(医学)の学位に値すると評価された。